FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-OUEST

ANNÉE 1973 N° 44

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR MARIE-ANNE GOUGEROT

NÉE LE 20 OCTOBRE 1947 A PARIS (10E)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LIPIDES ERYTHROCYTAIRES DANS LA SPHÉROCYTOSE HÉRÉDITAIRE

Président : Monsieur le Professeur Jean BERNARD

FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-OUEST

ANNÉE 1973 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR MARIE-ANNE GOUGEROT

NÉE LE 20 OCTOBRE 1947 A PARIS (10E)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES LIPIDES ERYTHROCYTAIRES
DANS LA SPHÉROCYTOSE HÉRÉDITAIRE

Président : Monsieur le Professeur Jean BERNARD

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mes Grands Parents

Les Professeurs Henri GOUGEROT et Noël FIESSINGER

A mon Père,

Le Professeur Louis GOUGEROT,

dont l'esprit original et passionné
m'émerveille constamment

A ma Mère,

A mes frères et soeurs.

En témoignage de toute ma tendresse

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544721_0022

A mon Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Jean BERNARD,

qui m'a fait le grand honneur de
présider cette thèse.

Il m'a accueillie dans son service lors
de mon externat puis de mon internat
et m'a enseigné une médecine tout à la
fois rigoureuse et profondément humaine

Qu'il reçoive ici l'expression de toute
ma reconnaissance et de ma respectueuse
admiration.

A mon Maître,

Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI

C'est au cours d'une année d'internat dans son service de Biochimie que j'ai pu accomplir la majeure partie de ce travail.

Je tiens à lui dire toute ma gratitude pour avoir mis à ma disposition les moyens de son laboratoire et m'avoir aidé de ses conseils.

A la mémoire de Madame M. PAYSANT

Maître de Recherche au CNRS,

qui, malgré son grave état de santé avait bien voulu guider mes premiers pas dans ce travail.

A Monsieur le Professeur P. BOIVIN

qui m'a paternellement accueillie et m'a permis de m'initier à la recherche de laboratoire et à la rigueur du raisonnement scientifique.

A Mon Maître,

Monsieur le Professeur V. VIC-DUPONT

Six mois d'internat dans son service m'ont permis de me retremper dans une des branches les plus vivantes de la médecine interne

A Monsieur J.J. POCIDALO

Directeur de Recherche à l'INSERM

qui, dans le domaine de la recherche médicale, m'a ouvert des horizons entièrement nouveaux.

A Monsieur le Docteur HAKIM

qui m'a le premier guidé dans la voie de la recherche médicale

A Monsieur le Docteur V. IZRAEL

qui m'a inspiré le sujet de cette thèse, et m'a constamment aidée dans sa réalisation.

En toute amitié.

A mes maîtres dans les Hôpitaux

EXTERNAT

Monsieur le Professeur L. AUROUSSEAU
Monsieur le Professeur A. MOUCHET
Monsieur le Professeur P. MILLIEZ
Monsieur le Professeur R. FAUVERT
Monsieur le Professeur P. BOIVIN
Monsieur le Professeur Jean BERNARD

INTERNAT

Monsieur le Professeur G. GUIOT
Monsieur le Professeur J. CANIVET
Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI
Monsieur le Professeur V. VIC-DUPONT
Monsieur le Professeur Jean BERNARD

A mes maîtres dans les Hôpitaux

EXTERNAT

Monsieur le Professeur L. AUROUSSEAU
Monsieur le Professeur A. MOUCHET
Monsieur le Professeur P. MILLIEZ
Monsieur le Professeur R. FAUVERT
Monsieur le Professeur P. BOIVIN
Monsieur le Professeur Jean BERNARD

INTERNAT

Monsieur le Professeur G. GUIOT
Monsieur le Professeur J. CANIVET
Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI
Monsieur le Professeur V. VIC-DUPONT
Monsieur le Professeur Jean BERNARD

A Mesdames WALD et BRETON

A Mesdemoiselles ECHTE et PIOT

Qui m'ont si efficacement aidée sur le plan technique.

A tous mes Amis.

P L A N

I - Introduction

II - Rappels cliniques et Biologiques

III - Etat des recherches actuelles sur les lipides de la membrane des globules rouges au cours de la Sphérocytose Héréditaire (S. H.)

IV - Travaux personnels

1 - Etude de l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides globulaires de Sphérocytose Héréditaire. Comparaison avec les résultats obtenus dans une Elliptocytose

a - Technique
b - Résultats
c - Interprétation

2 - Recherche de l'intervention d'un facteur plasmatique

- Mise en évidence d'une baisse du Cholestérol total plasmatique

- Etude de l'estérification du Cholestérol (Dosage de la L.C.A.T.)

a - Hypothèse
b - Techniques
c - Résultats

3 - Recherche d'une anomalie enzymatique dans le métabolisme lipidique érythrocytaire

A - Etude de la phospholipase A_2

.../...

a - Hypothèse

b - Technique

c - Résultats

B - Etude de la lipase

a - Technique

b - Résultats

c - Interprétation

V - Place de ces travaux dans le cadre général de la conception physiopathologique actuelle de la maladie

VI - Conclusion

N.B. Nous utiliserons les abrévations suivantes :

S.H. : Sphérocytose Héréditaire

G.R. : Globules rouges

I - INTRODUCTION

Depuis un siècle que la Sphérocytose Héréditaire (S.H.) a été décrite, c'est une des dernières hémolyses constitutionnelles à livrer son secret biochimique

Ces dernières années, un véritable bond en avant a été effectué dans la compréhension de sa physiopathologie : le mécanisme responsable est aujourd'hui cerné de près, mais non encore entièrement élucidé.

II - RAPPELS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

D'innombrables travaux ont précisé tous les caractères génétiques, cliniques et biologiques de la maladie, et une approche indirecte de l'étiologie a été tentée par cette voie.

En réalité, tous ces travaux n'ont abouti qu'à définir une entité clinique : la maladie de Minkowski-Chauffard ou sphérocytose héréditaire est une affection héréditaire familiale caractérisée par :

1 - Une anémie chronique de type hémolytique avec degré variable d'anémie et d'ictère, réticulocytose augmentée et splénomégalie

2 - Des stigmates hématologiques particuliers représentés par une microsphérocytose, une diminution de la résistance des globules rouges aux solutions salines hypotoniques, une augmentation de l'hémolyse spontanée in vitro, corrigée par le glucose, une séquestration splénique pure aux épreuves isotopiques.

3 - Enfin un bénéfice constant de la splénectomie.

A - Rappels des résultats observés dans une statistique clinique portant sur un grand nombre de cas

Un progrès dans cette approche indirecte a été effectué lors de la dernière statistique parue (28), concernant 229 malades du service du Professeur Jean BERNARD; statistique à laquelle nous avons participé et dans laquelle il est montré :

.../...

1 - Que sur le plan génétique la maladie est une entité univoque. Il n'y a notamment aucune différence, contrairement à la notion classique, entre formes familiales certaines et formes sporadiques, ces deux catégories s'intriquant dans un ensemble génétique cohérent, et leur différence apparente ne s'expliquant que par la notion de pénétrance variable.

2 - Que sur le plan clinique et biologique, la S.H. représente aussi une maladie homogène et que le pouvoir de discrimination des signes cliniques et biologiques n'est pas suffisant pour morceler le cadre classique de la maladie.

L'étude statistique réalisée sur 230 malades a, en effet, donné les résultats suivants :

a - Si 58 % seulement des malades présentent une anémie chronique de type hémolytique,
- 80 % ont une splénomégalie clinique,
- 89 % une réticulocytose élevée supérieure à 100 000 réticulocytes par mm^3
- 93 % ont une hyperbilirubinémie indirecte dont la moyenne se situe à $29,8 \pm 23,5$ mg/l.

b - Parmi les tests considérés jusqu'alors comme plus spécifiques de la maladie :
- 87 % des malades présentent une microsphérocytose,
- 90 % une fragilité osmotique anormale.

Chez tous les patients où le diagnostic de S.H. était indiscutable, et chez qui a été mesurée l'autohémolyse in vitro à 37°C; cet examen a montré une hémolyse élevée supérieure à 4 % et ramenée à la normale par le glucose, alros que l'ATP n'avait aucune action. Cet examen

.../...

nous a paru de loin, dans l'état actuel des connaissances, le meilleur test biologique de la maladie.

L'étude isotopique dans tous les cas où elle a été effectuée a confirmé l'existence d'une demi-vie des hématies raccourcie (en moyenne de 8 jours) et d'une séquestration splénique pure.

c - Enfin, sur le plan thérapeutique, dans tous les cas où la splénectomie a été faite, nous avons confirmé les observations classiques, c'est-à-dire :

- la guérison clinique complète
- la disparition des tests non spécifiques d'hémolyse chronique
- par contre, la persistance, à moindre degré, des anomalies dites "spécifiques" que sont la microsphérocytose, la résistance osmotique et l'autohémolyse spontanée in vitro.

Tout ceci témoigne bien que, par la splénectomie, a été éliminé le lieu de destruction électif des hématies, mais que l'anomalie fondamentale demeure. Effectivement, les études récentes de durée de vie après splénectomie ont bien montré que la demi-vie était corrigée, mais non ramenée totalement à la normale(5)

B - <u>La Maladie de Minkowski-Chauffard</u> : <u>maladie unique ou syndrome</u> ?

Tous ces résultats témoignent donc d'une entité pathologique unique et cohérente. Mais comment interpréter alors le polymorphisme apparent de la maladie, source de tant d'erreurs diagnostiques et de tant d'essais de fragmentation en maladies différentes (14-44-46) ?

.../...

a - Nous avons, en effet, encore confirmé ce polymorphisme apparent :

. non seulement l'intensité des symptômes non spécifiques, ne témoignant que de l'hémolyse chronique est très variable, tant d'un sujet à l'autre que chez un même sujet, à des moments différents,

. mais encore, les stigmates dits "spécifiques" varient également d'un sujet à l'autre, mais surtout chez le même sujet d'un moment à l'autre, en fonction de conditions physiologiques et pathologiques, ou plus généralement métaboliques, variables.

. par contre, à aucun moment n'apparaissent des symptômes "en plus", de type morphologique ou biochimique qui, dans les autres hémolyses chroniques orientent d'emblée vers une étiologie tels : corps de Heinz, déficit enzymatique électif etc...

b - l'analyse de cette variabilité apparente nous a conduit à la conclusion que :

. le trouble biochimique responsable au niveau des G.R. est unique ou tout au moins constitué d'une mosaïque de troubles extrêmement voisins, non dissociables par la clinique et le laboratoire de routine,

. que ce trouble biochimique s'exprime de façon variable selon les individus en fonction du contexte génétique ("pénétrance variable") et en fonction du temps selon les conditions du métabolisme général.

c - Nous verrons plus loin que cette analyse s'intègre parfaitement dans la conception physiopathologique moderne de la maladie : les signes dits "spécifiques" ne traduisent en effet que l'atteinte de la membrane globulaire : si on se réfère à la conception actuelle (77-78 79-80) selon laquelle il existe une "voie finale" commune

.../...

de l'hémolyse, c'est-à-dire que toute hémolyse, quelle que soit son étiologie (extra-corpusculaire, membranaire ou intracorpusculaire) commence par une altération de la membrane, de nombreuses hémolyses sinon toutes peuvent partager, avec la maladie de Minkowski-Chauffard, des symptomes communs, en particulier la microsphérocytose.

Le fait que seuls ces symptômes dits spécifiques à l'exclusion de tout autre, soient rencontrés dans la S.H. est un appui clinique en faveur de la théorie moderne selon laquelle le trouble primitif se situe dans la membrane érythrocytaire et là seulement. D'autres preuves plus directes existent évidemment pour étayer cette conception. Nous y reviendrons plus loin.

C'est justement à la recherche de ce trouble biochimique fondamental de la membrane que nous avons voulu contribuer.

III - ETAT DES RECHERCHES ACTUELLES SUR LES LIPIDES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES ROUGES AU COURS DE LA S.H.

Tous les lipides d'une hématie sont membranaires et il existe physiologiquement une instabilité de ces lipides dont la plupart sont en équilibre avec ceux du plasma. Ce mécanisme d'échange assure presque tout le renouvellement lipidique érythrocytaire puisque le G.R. adulte perd la majeure partie de ses capacités de synthèse lipidique (1-59-54-51). Il n'effectue pratiquement que des réactions d'acylation et de transacylation.

Dans ces conditions d'équilibre, le G.R. normal contient en poids environ 50 % de lipides dont 65 à 70 % de phospholipides, 20 à 25 % de Cholestérol libre (9). Au cours de son vieillissement, son capital lipidique diminue et il perd 5 à 10 % de ses lipides, sans modification de leur composition relative (75).

En ce qui concerne le Cholestérol libre érythrocytaire, l'existence d'un pool d'échange avec le plasma a été démontré avec du cholestérol marqué au Dentérium ou au Carbone ^{14}C. Cet échange est passif, ne nécessite aucun apport énergétique et se fait avec le Cholestérol des lipoproteines sériques (2-3-19-22-39-42-48).

Les phospholipides membranaires se renouvellent également : 60 % de la lécithine, 30 % des Sphingomyélines sont échangeables avec le plasma (64). Le renouvellement de la Lécithine se fait, soit par échange direct de la lécithine (pool mobile) (64), soit par acylation d'une molécule de lysolécithine, soit par transmutation de deux molécules de lysolécithine en une molécule de lécithine et une molécule de glycérophosphoryl choline (47).

In vitro, lorsque des G.R. normaux sont incubés à 37°. dans du plasma en présence de glucose, on constate une perte sélective de Cholestérol libre par les G.R.,

.../...

Cholestérol qui passe dans le plasma où il est estérifié sous l'influence de la Lécithine-Cholestérol-acyl-transférase (L.C.A.T) (7-49). Cette perte est réversible si les G.R. obtenus en fin d'expérience sont réincubés dans un plasma dont la L.C.A.T. a été détruite par chauffage à 56°C (7-49).

Ces mêmes G.R. normaux, incubés dans des conditions de déplétion métabolique, c'est-à-dire en absence de glucose, perdent non seulement du Cholestérol, mais encore des phospholipides, le tout dans une proportion identique à celle existant dans la membrane (7-62) Cette perte est irréversible (7).

Dans tous les cas, cette perte de lipides par la membrane, qu'il s'agisse de Cholestérol seul (7-49) ou de Cholestérol et de Phospholipides (7-62), entraîne une perte de surface érythrocytaire, avec réduction du rapport surface/volume du G.R. (apprécié par la mesure de la fragilité osmotique ou du volume hémolytique critique (49-79), dont la traduction morphologique directe est la constitution d'un microsphérocyte : c'est en effet la forme répondant à la surface minimale pour un volume donné (6-49). Un G.R. normal peut donc aboutir, par simple perte lipidique, à la formation d'un microsphérocyte.

Dans la S.H., divers auteurs ont montré que l'instabilité des lipides membranaires était accrue de façon considérable : alors qu'incubés en présence de glucose, les G.R. des S.H. se comportent normalement en perdant de façon sélective et réversible du Cholestérol en quantité identique aux G.R. normaux, incubés en condition de déplétion métabolique, ils perdent beaucoup plus de phospholipides et de Cholestérol que ceux des sujets normaux (8-62) ; les proportions de Cholestérol et de Phospholipides restent cependant les mêmes.

.../...

Cette perte pathologique de lipides en condition de déplétion métabolique apparaît comme le mécanisme direct de la microsphérocytose observée au cours de la S.H.

Ce mécanisme représente-t-il le trouble biochimique fondamental de la maladie, ou plutôt un reflet indirect d'un trouble situé en amont ? De nombreux travaux ont essayé de préciser d'une part l'anomalie lipidique, d'autre part sa place exacte dans la séquence physiopathologique de la maladie.

a - Pour préciser l'anomalie lipidique elle-même, les travaux ont porté dans deux directions :

- essayer de mettre en évidence une anomalie statique de la composition absolue ou relative des lipides du microsphérocyte,
- essayer de démontrer un trouble dynamique du métabolisme de ces lipides.

b - Pour préciser la place de l'anomalie lipidique dans le concept physiopathologique de la maladie, les recherches ont porté sur les relations d'interdépendance entre le trouble lipidique et les autres troubles physio-pathologiques érythrocytaires constatés au cours de la S.H., en particulier l'anormale perméabilité au sodium, afin de déterminer le primum movens de ces différents phénomènes.

A - Nous envisagerons d'abord les travaux portant sur la composition et le métabolisme lipidique des G.R. de la S.H.

1 - La composition lipidique du G.R. normal a été bien établie par de nombreux auteurs (9-61-73-76) : les phospholipides représentent 65 à 70 % des lipides totaux, le Cholestérol 20 à 25 %, les glycosphingolipides 2 % et il existe des traces d'acides gras libres. La composition phospholipidique est, en moyenne, de 30 à 35 %

.../...

de Lécithine, 22 à 25 % de Sphingomyéline, 27 à 30 % de Phosphatidyléthanolamine, 6 à 10 % de Phosphatidylsérine, 1 à 3 % d'acide phosphatidique et de polyglycérol phosphatides, 1 à 2 % de Lysolécithine.

L'analyse des lipides des G.R. dans la S.H. a montré que :

- La proportion relative des différents composants lipidiques n'était pas modifiée (8-12-58-62).

- le capital global des lipides est normal ou légèrement abaissé malgré un nombre élevé de réticulocytes (8-41-62), mais, il reste en fait diminué de 15 à 20 % par rapport aux sujets normaux splénectomisés (8). Si le capital global lipidique apparaît dans certains cas diminué de façon inconstante ou variable, ceci tient au fait que sa diminution n'est que le reflet d'un taux de microsphérocytes très variable au cours du temps et souvent petit en regard de la précision des méthodes de dosage.

Ainsi, en dehors d'un trouble quantitatif, il n'y a pas d'anomalie qualitative majeure des lipides érythrocytaires dans la S.H. ; une réserve reste pourtant à faire provenant d'un travail récent de KNIPER et LIVNE (38) qui auraient mis en évidence des anomalies portant sur la proportion relative des acides gras intervenant dans l'estérification des phospholipides érythrocytaires ; mais ce travail unique demande une confirmation ultérieure.

2 - Quant aux travaux sur la dynamique des phospholipides érythrocytaires, ils se résument, jusqu'à aujourd'hui, à des études d'incorporation de phosphate ^{32}P dans les phospholipides érythrocytaires. Bien qu'effectués par de nombreux auteurs, ces études ont souvent donné des résultats contradictoires, aussi bien chez le sujet normal que porteur d'une S.H.

Chez le sujet normal, si tous les travaux concordent quant au fait que le phosphate de l'acide phoosphatidique, phospholipide présent en quantité très réduite

.../...

dans la membrane érythrocytaire, se renouvelle activement à partir de l'A.T.P., des divergences existent (63-81) quant à l'incorporation du phosphate ^{32}P dans d'autres phospholipides : phosphatidylinositol (27), phosphatidylsérine (33), phosphatidyléthanolamine (21).

Chez le sujet atteint de S.H., presque tous sont d'accord sur le fait que l'incorporation du phosphate ^{32}P est accrue dans les phospholipides membranaires. Mais, pour certains, ce renouvellement accrue du phosphore phospholipidique atteint uniquement l'acide phosphatidique (63) pour d'autres atteint, outre ce dernier, d'autres phospholipides et notamment la phosphatidylsérine (33).

Quoiqu'il en soit, le temps de renouvellement du phosphore phospholipidique est très lent et représente au plus, moins de 0,1 % du phosphore lipidique total de la membrane par heure (63).

B - Nous n'envisagerons pas maintenant le détail des travaux visant à préciser la place de l'anomalie lipidique dans la séquence physiopathologique de la maladie.

De nombreux auteurs ont cherché à éclaircir les interrelations des diverses anomalies lipidiques (perte de lipides,par la membrane créant le microsphérocyte et renouvellement accru du phosphore phospholipidique) ainsi que les relations de ces anomalies avec celles du métabolisme sodé et du trouble génétique primitif, depuis HOKIN et HOKIN (25-26) qui attribuent un rôle direct aux phospholipides comme transporteur de cations et donc à l'accroissement de leur renouvellement comme cause de l'hyperperméabilité sodée, jusqu'à JACOB qui, récemment, relie tous les symptômes biologiques de la S.H. à une anomalie structurale d'une protéine membranaire (35-36). Nous y reviendrons plus loin.

.../...

Au terme de ce chapître, il apparaît cependant que les anomalies du métabolisme lipidique constatées dans la S.H. semblent être la conséquence d'un phénomène situé plus en amont. Ce phénomène primitif, quel qu'il soit, ne peut agir sur les lipides que, soit par une anomalie d'un mécanisme enzymatique, soit par une anomalie du métabolisme énergétique nécessaire au métabolisme lipidique, soit par une anomalie de la synthèse des constituants membranaires : dans tous les cas, le primum movens ne peut donc être qu'une anomalie protéique située, soit au niveau d'une ou plusieurs protéines enzymatiques globulaires ou extraglobulaires, soit au niveau d'une protéine de structure de la paroi érythrocytaire.

IV - TRAVAUX PERSONNELS

De toutes ces observations découle le plan de notre travail qui a eu un double but :

- apporter notre propre contribution à l'étude de l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les Phospholipides membranaires de G.R. sphérocytaires, afin d'essayer d'éclaircir ce point très controversé et de comparer les résultats obtenus dans la S.H. à ceux obtenus dans une maladie globulaire voisine : l'elliptocytose.

- entreprendre, ce qui n'avait pas encore été fait, l'étude de plusieurs phénomènes enzymatiques intervenant dans le métabolisme lipidique et dont l'anomalie pourrait être le primum movens de la S.H. ou intervenir dans la physiopathologie de certains symptômes biologiques :

. d'une part, l'activité de la L.C.A.T. sérique qui règle les échanges cholestéroliques entre le G.R. et le plasma

. d'autre part, l'activité de deux enzymes corpusculaires susceptibles d'intervenir dans le métabolisme lipidique : laphospholipase A_2 et la lipase.

I - Comparaison de l'incorporation du phosphate ^{32}P dans les phospholipides globulaires de Sphérocytose Héréditaire et d'Elliptocytose.

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs auteurs ont réalisé des incorporations de phosphate ^{32}P dans les phospholipides globulaires des S.H. et ont publié des résultats et des interprétations physiopathologiques diverses, voire contradictoires. Nous avons entrepris de contrôler ces expériences dans le but essentiel de vérifier le lieu d'incorporation accru du phosphate ^{32}P, et nous en avons profité pour comparer ces résultats à ceux obtenus dans une Elliptocytose, autre anémie hémolytique en rapport avec une anomalie primitive de la membrane, aux signes biologiques voisins, mais originale par sa dysmorphie globulaire et sa transmission génétique.

a - Technique

L'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides globulaires a été réalisée selon la méthode de H.S. JACOB et M. KARNOVSKY (33) : le sang est prélevé sur A.C.D. (acide citrique - citrate - dextrose), les globules rouges sont centrifugés et lavés deux fois dans leur milieu d'incubation, la couche de globules blancs et de plaquettes est ôtée le plus complètement possible. 2 ml de globules rouges sont alors resuspendus à un hématocrite de 50 % dans le milieu d'incubation ; celui-ci contient K^+ 3,5 m M/l, Na^+ 160 M/l, HPO_4^{--} 30 mM/l, HCO_3^- 25mM/l, Cl^- 163,5 mM/l, Glucose 22mM/l, serum albumine 5 % ; le PH est ajusté à 7,4 avant l'incubation. 3 flacons d'incubation de sang pathologique sont ainsi préparés et comparés à des incubations témoins de sang normal traité dans les mêmes conditions. Dans chaque flacon d'incubation est ajouté 100 µCi de phosphate ^{32}P (activité spécifique 20 uCi/ µg) par ml de G.R. incubé.

Une incubation est arrêtée immédiatement après l'introduction de Phosphate ^{32}P. le délai d'environ 1 mn est considéré comme le temps O. Puis les autres incorporations sont arrêtées respectivement après 2 et 4 heures d'incubation.

L'arrêt de l'incubation se fait par adjonction de 10 volumes de tampon phosphate glacé iso osmotique au plasma de PH 7,4 , suivi de 2 autres lavages par le même tampon phosphate glacé afin de retirer le plus possible de phosphate ^{32}P non incorporé.

Le culot globulaire est alors lysé par l'eau distillée et les lipides extraits par un mélange Chloroforme Méthanol 1/2 (v/v) après avoir broyé les G.R. à l'Ultraturrax. Le culot est lavé 2 fois par le même mélange Chloroforme/Méthanol 2/1 (v/v) et d'une solution de NaCl 1 °/oo dans l'eau selon une technique dérivant de celle de Folch-Svennerholm (72). L'ampoule est agitée vigoureusement puis laissée au repos vingt-quatre heure à la température du laboratoire ; il se forme 2 phases dont l'une inférieure chloroforme/Méthanol contient les lipides, l'autre supérieure les gangliosides et autres substances hydrosolubles. A l'interphase peut exister une émulsion qui est séparée par centrifugation et réunie aux lipides.

L'extrait lipidique ainsi épuré des substances hydrosolubles est recueilli dans un ballon et évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. L'extrait sec est repris par du chloroforme.

Toute cette expérience sera effectuée sous athmosphère d'azote.

Des échantillons de ces extraits sont alors pris pour doser le phosphore selon la méthode de Fiske, modifiée par Delsal (13), ainsi que pour compter la radioactivité dans un détecteur Nuclear Chicago à courant d'Hélium ce qui permet de calculer l'activité spécifique en cpm/ µgP.

Des chromatographies en couche mince de gel de silice selon Stahl (7) sont déposées avec migration en phase neutre Chloroforme/Méthanol/eau 65/25/4 (v/v/v) et en phase acide Chlororme/Méthanol/acide acétique/eau 50/30/8/4 (v/v/v/v) selon Skipski (69).

.../...

Les phosphatides sont localisées à l'iode et les groupes aminés à la Ninhydrine. Une autr radiographie de la plaque est effectuée.

En pratique, cette méthode ne nous a pas donné de résultats très interprétables car l'acide phosphatidique se dégrade, bien que l'extraction lipidique soit constamment effectuée sous atmosphère d'azote, et laisse des traînées radioactives tout au long de sa migration.

L'identification des Phospholipides radioactifs n'a donc pu être faite avec précision qu'après une hydrolyse alcaline douce (11), dépôt d'une chromatographie sur papier dans une phase : Phénol/eau/acide acétique/éthanol 50/22/3/3 (v/v/v/v) (20), et pose d'un autoradiogramme. Chacun des spots radioactifs est ensuite découpé et compté au Nuclear Chicago. Leur identification est faite d'après leur Rf en le les comparant à des témoins déposés simultanément sur la chromatographie : Glycérophosphate et phosphate dont le groupe phosphate se colore spécifiquement, phosphatidyl éthanolamine ^{32}P et Phosphatidylsérine hydrolysée de façon identique aux extraits étudiés. Le groupe amine des glycérylphosphorylsérine et glycérylphosphoryléthanolamine sont repérés par coloration à la Ninbydrine. La glycérylphosphoryl-éthanolamine ^{32}P est repérée par l'autoradiogramme.

L'incorporation a été réalisée :

- d'une part sur le sang des 3 malades atteints de Sphérocytose Héréditaire de diagnostic certain, dont 2 étaient splénectomisés et un non splénectomisé ;

- d'autre part, sur le sang d'un patient atteint d'Elliptocytose,

face à des témoins normaux pris au centre départemental de transfusion sanguine ou appartenant au personnel hospitalier.

.../...

b - Résultats

L'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides globulaires est exprimée en cpm/ug de phosphore qui est l'activité spécifique (A.S.) au temps t. L'activité spécifique trouvée au temps O ($A.S_o$) qui correspond au lavage immédiat de l'incubation par du tampon phosphate glacé est soustrait des activités brutes à 4 h ($A.S_b$) donnant l'activité corrigée AS. Cette activité au temps O est relativement élevée : chaque lavage dure 15 mn et le phosphore glacé n'inhibe pas absolument totalement toute incorporation. Nous avons effectué cette expérience d'incorporation à froid durant 4 heures : l'activité spécifique était de 25 cpm/ug de P ce qui correspond à celle des lavages au phosphate glacé. Les corrections dues à l'âge du phosphate ^{32}P ont été faites d'après sa courbe de décroissance radioactive en fonction du temps. (tableau 1).

1 - Cinétique de l'incorporation du Phosphate ^{32}P-

Les résultats trouvés ont été colligés dans le tableau n° 1 ; on constate :

- que l'incorporation du phosphate ^{32}P est deux fois plus importante dans les phospholipides globulaires de Sphérocytoses que dans ceux dés témoins.

- qu'il n'y a pas de différence significative entre l'enfant de 6 ans splénectomisé ($\frac{AS\ témoin}{AS\ malade}$) = 1,02 et les deux adultes splénectomisés ($\frac{AS\ t}{AS\ m}$) = 2,04 en moyenne

- que l'enfant atteint d'Elliptocytose a également une incorporation plus élevée que dans la S.H., environ 3,5 fois plus importante que le témoin. Mais n'ayant pu étudier qu'un cas d'Elliptocytose héréditaire, nous ne pouvons conclure à une différence significative entre les deux affection quant à l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans leurs phospholipides globulaires.

Si nous traçons la courbe cinétique moyenne de l'incorporation en fonction du temps, nous obtenons le graphique suivant : tandis que l'incorporation tend vers un plateau à 4 h. chez le sujet normal, elle continue de croître dans les Sphérocytoses, ainsi que dans l'Elliptocytose. En Tenant compte des écarts-types, la différence d'incorporation devient significative à partir de 4 heures (Fig 1).

.../...

ugP/ml GR	cpm/mlGR	AS_b	AS_o	AS	ugP/mlGR	cpm/mlGR	AS_b	AS_o	AS	ASt/ASm
115	29 500	250	50	200	1 - 113	52 400	450	45	405	2,02
108	19 280	178	45	133	2 - 108	33 920	315	45	270	2,03
116	21 800	185	25	160	3 - 117	40 500	350	20	330	2,06
133	17 800	134	4	130	4 - 113	53 700	475	4	471	3,6

$AS = AS_i - AS_o$ en cpm/ugP

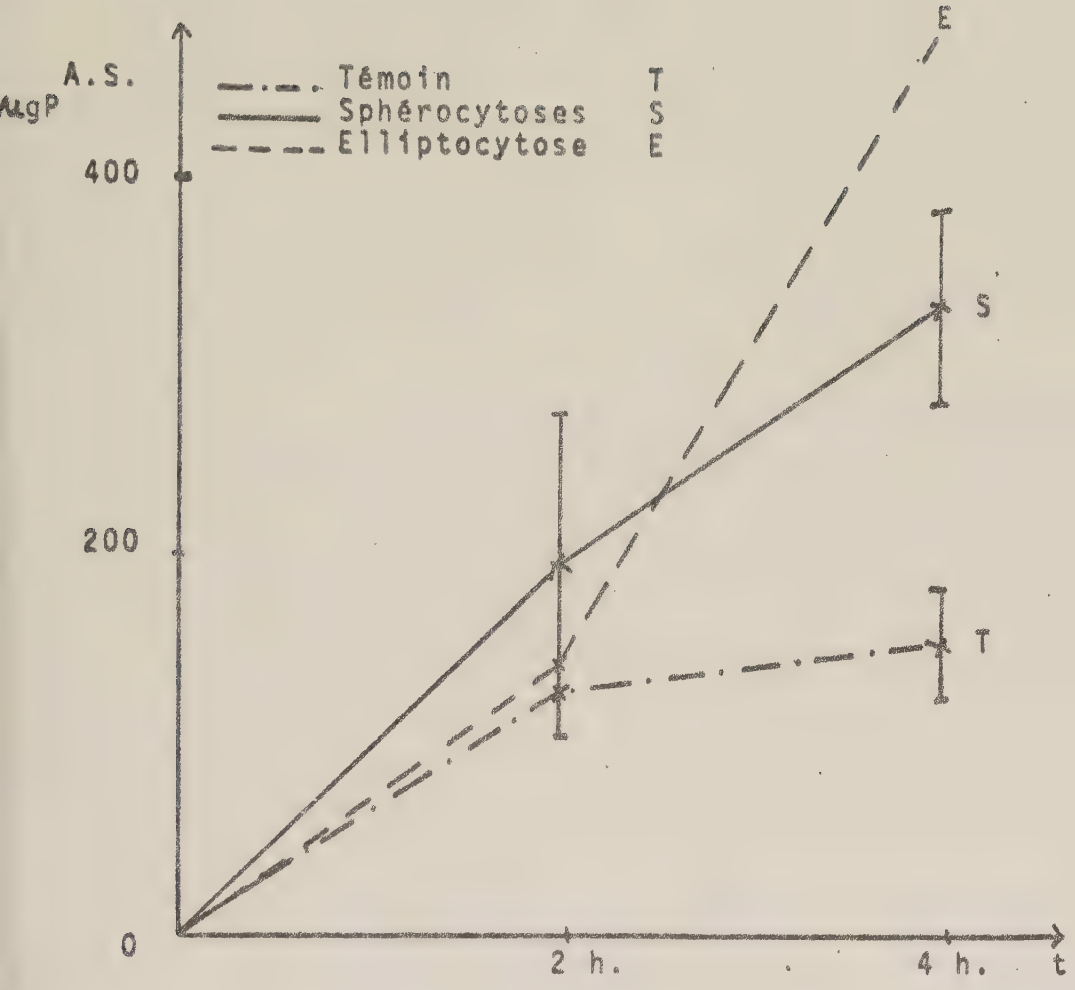
Malades

1 - Sphérocytose héréditaire. Enfant 6 ans non splénectomisé
2 - " " Femme 35 ans splénectomisée
3 - " " Femme 58 ans splénectomisée
4 - Elliptocytose Enfant 12 ans non splénectomisé

INCORPORATION DU PHOSPHATE INORGANIQUE ^{32}P DANS LES PHOSPHOLIPIDES DES G.R.

de S. H.
d'Elliptocytose
de témoins

TABLEAU I



Incorporation du Phosphate ^{32}P dans les Phospholipides globulaires de témoins normaux T de Sphérocytoses S et d'une Elliptocytose E en fonction du temps

T_{2h} = 133 ± 23,5 cpm/µgP M_{2h} = 198 ± 85 cpm/µgP

T_{4h} = 155 ± 28 cpm/µgP M_{4h} = 335 ± 51 cpm/µgP

E_2 = 142 cpm/µgP

E_4 = 471 cpm/µgP

2 - Lieu d'incorporation du Phosphate ^{32}P

Le lieu d'incorporation du Phosphate ^{32}P déterminé par chromatographie sur papier des produits de l'Hydrolyse alcaline douce est essentiellement : l'acide phosphatidique.

Chez le sujet normal, l'incorporation se fait à 75 % environ dans l'acide phosphatidique, le reste de la radioactivité étant également réparti entre phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine.

Chez les 3 Sphérocytoses étudiées, l'incorporation se fait en majorité dans l'acide phosphatidique et l'augmentation de l'incorporation se trouve à ce niveau.

L'Elliptocytose a les mêmes caractéristiques de ce point de vue que les Sphérocytoses

Témoins	Malades
72 %	1 - 84 %
94 %	2 - 97,5%
73 %	3 - 85 %
75 %	4 - 85 %

1 - S.H. non splénectomisé
2 - S.H. splénectomisé
3 - S.H. splénectomisé
4 - Elliptocytose

POURCENTAGE D'INCORPORATION DANS L'ACIDE PHOSPHATIDIQUE

c - Interprétation

Ayant repris les expériences d'incorporation de phosphate ^{32}P faits par Jacob et Karnonsky (33) dans les S.H., nous avons trouvé des résultats semblables quant à l'incorporation globale dans les phospholipides, mais le lieu

.../...

de cette incorporation s'est avéré pour nous être essentiellement l'acide phosphatidique : nous n'avons pas trouvé chez les S.H. une élévation d'activité spécifique notable dans la phosphatidylsérine. Ces résultats sont, par contre, en accord avec ceux d'autres auteurs ayant employé des méthodes différentes (63).

Comment interpréter cette incorporation accrue de Phosphate ^{32}P ?

1 - Comme l'anomalie génétique primitive de la maladie :

a - Les expériences de Hokin et Hokin (25-26) avaient montré une relation entre la perméabilité aux cations et le métabolisme des phospholipides dits "acides" (acide phosphatidique et phosphatidylsérine), conduisant à la conclusion que ces phospholipides jouaient le rôle de transporteur de cations ; ce transport impliquant la déphosphorylation de l'acide phosphatidique par une phosphatase et la rephosphorylation d'un diglycéride par une kinase spécifique et un ATP. Un turnover augmenté de ces phospholipides rendrait alors compte de l'augmentation de la perméabilité aux cations. Mais, cette hypothèse fut contreversée par des expériences ultérieures : s'il existe bien pour certains, une corrélation entre flux sodé et renouvellement phospholipidique, différentes considérations sur les rapports stoechiométriques entre le transport des cations et le marquage par le phosphate ^{32}P des phosphatides rend improbable l'intervention directe de ceux-ci comme transporteurs de cations à travers la membrane (18-67) : 3 ions Na^+ sont transportés lorsqu'un ATP est utilisé, alors que si l'acide phosphatidique était le transporteur, 2 ions Na^+ au maximum pourraient être transportés par molécule d'ATP utilisée. L'élévation du turnover du phosphate phospholipidique dans la S.H. ne semble donc pas être l'anomalie génétique primitive responsable du trouble de la perméabilité aux cations.

.../...

b - par ailleurs, il est difficile d'affirmer qu'il s'agit de la cause première spécifique de la maladie puisque nous avons trouvé des résultats identiques quant à l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides érythrocytaires d'une Elliptocytose Héréditaire: mais il est vrai que ce sont des maladies dont le trouble génétique est probablement très voisin.

2 - L'élévation du turnover phospholipidique serait-il conséquence indirecte d'une anomalie primitive située plus en amont ?

Différentes hypothèses, toutes discutées, essaient de relier trouble de perméabilités aux cations, microsphérocytose, élévation du turnover du phosphate et de les rattacher à une anomalie génétique unique et primitive.
Nous envisagerons quelques-unes de ces hypothèses

a - Jacob, avant ces récentes expériences sur les protéines membranaires, interprétait la maladie de la façon suivante : l'élévation du turnover des phospholipides est cause directe de la microsphérocytose et la conséquence de l'hyperperméabilité aux cations, elle-même dépendant de l'anomalie génétique primitive non identifiée (33). A la suite d'incubations en milieu hypertonique, d'exposition des G.R. au butanol, d'inhibition de l'ATPase par l'Ouabaïne JACOB a en effet montré une étroite corrélation entre le métabolisme sodé et le renouvellement du phosphate phospholipidique : de l'acide phosphatidique, mais surtout de la phosphatidylsérine. Le renouvellement accru des phospholipides membranaires serait pour lui directement responsable de la microsphérocytose par diminution de l'affinité des lipides pour la membrane.

b - Pour d'autres, et notamment pour REED, ces assertions ne sont pas vérifiées (63). Des expériences d'incubation modifiant la perméabilité aux cations ne vérifient pas la corrélation entre celle-ci et le renouvellement du

.../...

Phosphate phospholipidique. Par ailleurs, celui-ci, calculé après incorporation de Phosphate ^{32}P ne représente au plus que 0,1 % des lipides membranaires et ne peut rendre compte de la perte lipidique constatée lors de la formation de microsphérocytes : perte estimée à 20 % des lipides membranaires.

D'autres arguments vont à l'encontre d'une corrélation entre métabolisme sodé et métabolisme lipidique. Dans différentes espèces animales, il n'y a pas de corrélation entre la teneur globulaire en cations et la composition lipidique membranaire : notammentdans les G.R. de mouton à haut potassium (HK) et dans ceux à bas potassium (L.K.) (52-53). De plus, chez l'homme existent des anémies hémolytiques avec très haut Na+ et bas K+ érythrocytaire et très forte augmentation des échanges cationiques ; or, ces G.R. ne présentent pas d'anomalies de composition ou de renouvellement de leurs lipides membranaires (55-84).

Tous ces faits tendent donc à prouver que l'élévation du turnover des phospholipides n'est pas dû au trouble du métabolisme sodé.

c - Une dernière hypothèse pour tenter d'expliquer l'élévation du turnover est le rôle joué par l'hyperréticulocytose (63). C'est l'hypothèse que Reed soulève ayant trouvé une élévation de l'incorporation du phosphate ^{32}P dans une anémie hémolytique non sphérocytaire. Ayant nous-même réalisé une telle incorporation chez un sujet présentant une anémie hémolytique inexpliquée avec 300 000 réticulocytes/mm^3. Celle-ci s'est avérée normale (A.S. = 102 cpm/µg P au bout de 4 heures). Si la jeunesse des G.R. peut contribuer à élever l'incorporation du Phosphate ^{32}P, le métabolisme réticulocytaire étant certainement plus actif que celui des G.R. adultes, elle ne peut donc expliquer à elle-seule les résultats trouvés au cours de la S.H.

.../...

En tenant compte des différents travaux que nous avons exposés et à la lumière des travaux plus récents portant sur les protéines membranaires, nous pensons que l'élévation de l'incorporation du Phosphate ^{32}P peut être intégrée de la façon suivante dans la physiopathologie de la maladie (qui sera vue plus loin) : l'élévation du turnover du Phosphate phospholipidique n'est ni la cause de la microsphérocytose, ni celle de hyperperméabilité au Na^+ une anomalie génétique indéterminée encore, mais portant probablement sur la structure d'une proteine membranaire (35-36) serait responsable de ces deux symptômes biologiques sans intervention directe du renouvellement phospholipidique. Celui-ci ne serait alors qu'un reflet de l'hypermétabolisme érythrocytaire.

- s'il existe une relation entre l'élévation de l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides membranaires et l'hyperperméabilité aux cations, cette relation pourrait se faire par l'intermédiaire d'une élévation de l'ATPase, enzyme nécessaire à l'activité de la pompe à sodium et fournissant du phosphate inorganique qui peut rephosphoryler les diglycérides en acide phosphatidique. Or cette enzyme est élevée dans la S.H. (50), l'hyperperméabilité au sodium ayant pour conséquence une hyperactivité de la pompe à sodium et donc de l'ATPase.

- s'il n'existe pas de relation entre perméabilité aux cations et turnover, l'élévation de celui-ci peut n'être qu'un reflet de l'hypermétabolisme du G.R. devant le catabolisme accru des phospholipides. Le renouvellement de l'acide phosphatidique ne peut pas dans le G.R. adulte conduire à unesynthèse de nouveaux phospholipides, cette voie de synthèse étant atrophiée dans le G.R. adulte. L'élévation de l'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les Phospholipides membranaires ne serait donc qu'un essai de compensation inefficace du G.R.

II - Recherche de l'intervention d'un facteur plasmatique

- Mise en évidence d'une baisse du Cholestérol total plasmatique.

Dans la statistique clinique effectuée dans le service du Professeur J. BERNARD, nous avons observé une diminution significative du taux du cholestérol total plasmatique chez 230 sujets atteints de sphérocytose héréditaire (28).

- Etude de l'estérification du Cholestérol.

a - Hypothèses

Nous avons pensé que la perte du Cholestérol par la membrane globulaire aboutissant à la formation de microsphérocytes pourrait être reliée à un hypercatabolisme du cholestérol libre plasmatique qui s'équilibre avec le cholestérol globulaire formé essentiellement de cholestérol libre.

Cet hypercatabolisme pourrait être dû à une hyperactivité de la Lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT), qu'il existe un activateur anormal ou une répression d'un inhibiteur notamment lipoprotéinique ou une dérépression de la synthèse de l'enzyme.

Le cholestérol estérifié formé en grande quantité pourrait entraîner une diminution du cholestérol total, soit en réprimant la synthèse du cholestérol au niveau de l'hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A synthétase par exemple; soit en subissant lui-même un catabolisme accru pour compenser sa synthèse rapide.

Nous avons donc étudié dans le plasma de trois malades l'estérification du cholestérol par :

1 - le rapport $\frac{\text{Cholestérol estérifié}}{\text{Cholestérol total}}$

2 - l'activité LCAT

3 - le lipidogramme

.../...

b - Techniques

1 - Rapport d'estérification du cholestérol

Il est effectué en séparant sur chromatographie en couche mince de gel de silice le cholestérol libre de l'estérifié par migration selon Skipski (70).

Le cholestérol est repéré par exposition à des vapeurs d'Iode puis, après évaporation de l'iode, élué par un mélange chloroforme-méthanol 1/1 (v/v).

Le dosage de chaque fraction libre et estérifié est fait selon la méthode de Macheboeuf (43).

2 - Dosage de la LCAT

Il est fait par la méthode de Glomset et Whright (17), légèrement modifiée : 2 ml de plasma frais contenant l'enzyme sont ajoutés au milieu d'incubation contenant le substrat fait de 0,3 µci de cholestérol 4 ^{14}C fixé sur 0,5 ml d'une solution saline d'albumine humaine à 5 % (60) et de 2,5 ml de plasma humain chauffé : ce plasma humain provenant du centre départemental de transfusion sanguine de l'Hôpital Saint Antoine, prélevé sur A.C.D., est chauffé durant 1 heure à 56° C, afin d'inactiver la LCAT présente. Une grande quantité du même plasma est préparée simultanément afin d'utiliser le même substrat dans toutes les expériences. Il est réparti en petites fractions et conservé à -20° C. L'incubation est faite dans des tubes bouchés à 37°, avec agitation pendant 6 heures. Elle est arrêtée par adjonction de 10 volumes de chloroforme-méthanol 1/2 (v/v) qui réalise l'extraction lipidique du milieu et notamment du cholestérol libre et estérifié. Après deux lavages au 1/2 les ballons sont évaporés et repris par un volume de chloroforme-méthanol 1/1 (v/v) équivalent au volume d'incubation extrait. La séparation du cholestérol libre et estérifié est chromatographique selon la méthode déjà exposée. Le gel correspondant au cholestérol estérifié repéré à l'iode ou sur l'autoradiogramme est compté dans un compteur à scintillations.

.../...

L'activité spécifique du cholestérol libre du milieu d'incubation est déterminée après élution du cholestérol libre et permet d'exprimer l'activité enzymatique en m µM de cholestérol estérifié par heure et par ml de plasma frais.

3 - Le lipidogramme

Il est fait par électrophorèse sur acétate de cellulose, coloration au rouge Ciba et lecture à l'enregistreur intégrateur (Cellomatic).

c - Résultats

1 - Le rapport Cholestérol estérifié/Cholestérol total plasmatique s'est avéré normal (65 % en moyenne) notamment chez une enfant de 5 ans en poussée hémolytique aiguë dont le cholestérol total était très bas : 0,9 g/l. . Les résultats sont colligés dans letableau ci-dessous.

Splénectomie	Chol. Tot. (g/l)	Chol. estérifié/Chol. Tot.
N° 1 Non	1,39	60 %
N° 2 Non	0,9	69 %
N° 3 Oui	1,34	65 %

2 - Ceci n'exclue pas, comme nous l'avons vu la possibilité d'une hyperactivité LCAT dans la mesure où le catabolisme du cholestérol estérifié est lui-même augmenté : nous avons donc dosé la LCAT chez 2 sujets non splénectomisés en poussée hémolytique (cas n° 1 et n° 2) et chez un sujet splénectomisé depuis 2 ans (cas n° 3)

En comparant les pourcentages de cholestérol estérifié marqué, transformé dans le même temps par les mêmes quantités d'enzyme, on observe un pourcentage significativement plus élevé chez les malades qu'ils soient ou non splénectomisés. Il faut toutefois tenir compte de l'activité

spécifique du cholestérol dans le milieu d'incubation : le taux de cholestérol des malades étant inférieur à celui des témoins, le 14 C Cholestérol est moins dilué dans le milieu et le pourcentage de 14 C Cholestérol estérifié est de ce seul fait plus élevé que chez le témoin.

Ainsi en tenant compte de l'activité spécifique (A.S.), l'activité enzymatique étant exprimée en millimicromole de cholestérol estérifié par heure et par millilitre d'enzyme (mμM/h/ml), l'activité est sensiblement identique chez les témoins et les malades que ceux-ci soient ou non splénectomisés (cf tableau 2 et fig. 1)

3 - L'étude du lipidogramme de ces trois sujets n'a pas révélé de modification de celui-ci.

	Cholestérol total g/l		A.S. du Chol. libre dans le milieu cpm/ugchol.		% estérification en 6 heures		Activité enzyma- mμM/h/ml	
	T	M	T	M	T	M	T	M
N° 1	1,69	1,39	610	640	8,5	12	7	6
N° 2	1,51	0,9	1220	1380	7	9	10	12
N° 3	1,62	1,34	970	800	5	7	12,1	10,3

MESURE DE L'ACTIVITE LCAT CHEZ TROIS SUJETS ATTEINTS DE S.H. (M) DONT 2 EN POUSSEE HEMOLYTIQUE (N° 1 et N° 2) ET LE TROISIEME SPLENECTOMISE DEPUIS 2 ANS. COMPARAISON AVEC L'ACTIVITE DE SUJETS TEMOINS (T) NON SPLENECTOMISES

TABLEAU 2

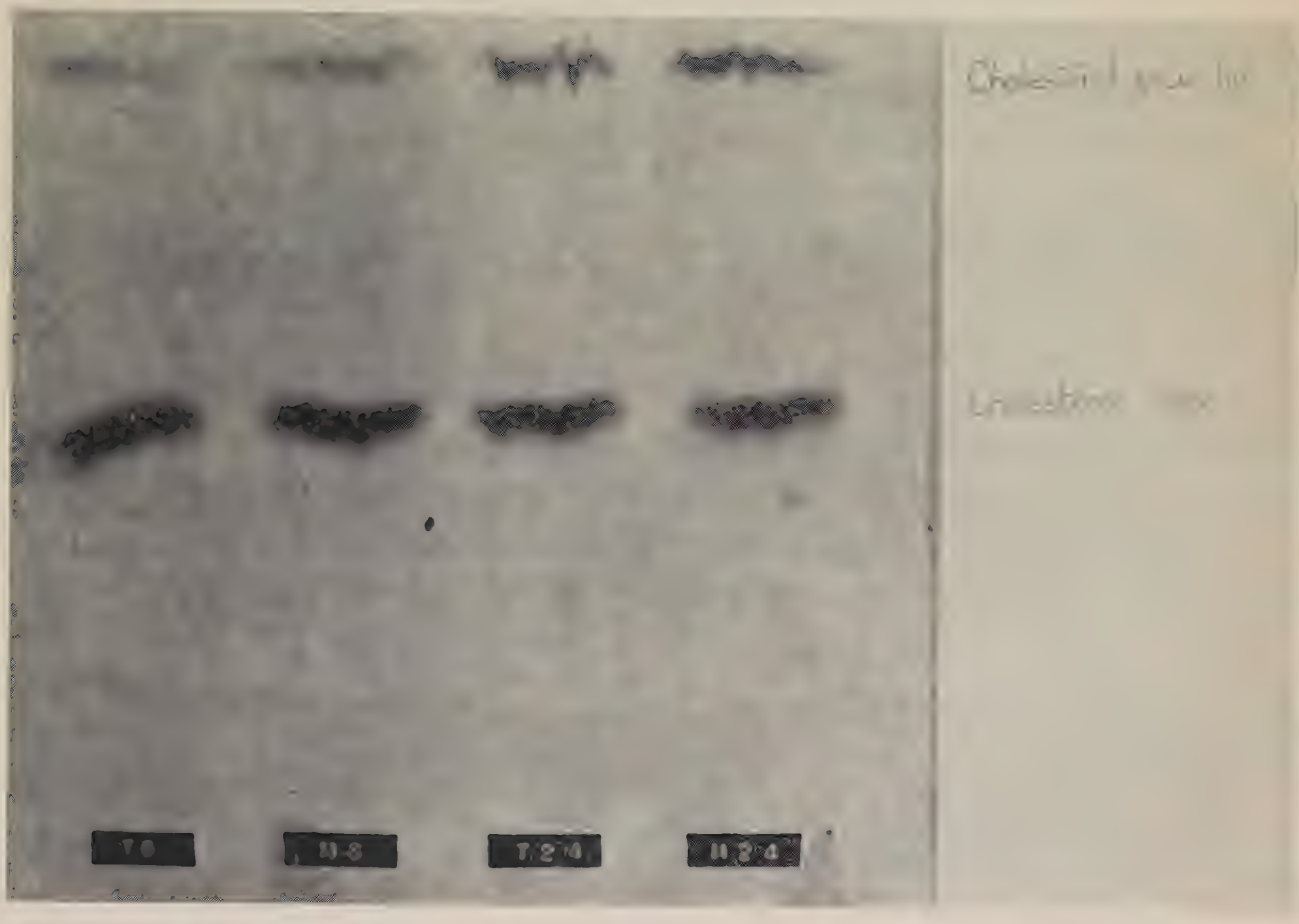


Photo n° 1

Comparaison de l'activité enzymatique de la Lécithine-Cholestérolacyl-Transférase (L.C.A.T.) entre un sujet témoin (T) et un sujet atteint de Sphérocytose Héréditaire (M). Etude après 6 heures (T 6 et M 6) et 24 heures (T 24 et M 24) d'incubation.

III - Recherche d'une anomalie enzymatique dans le métabolisme lipidique érythrocytaire.

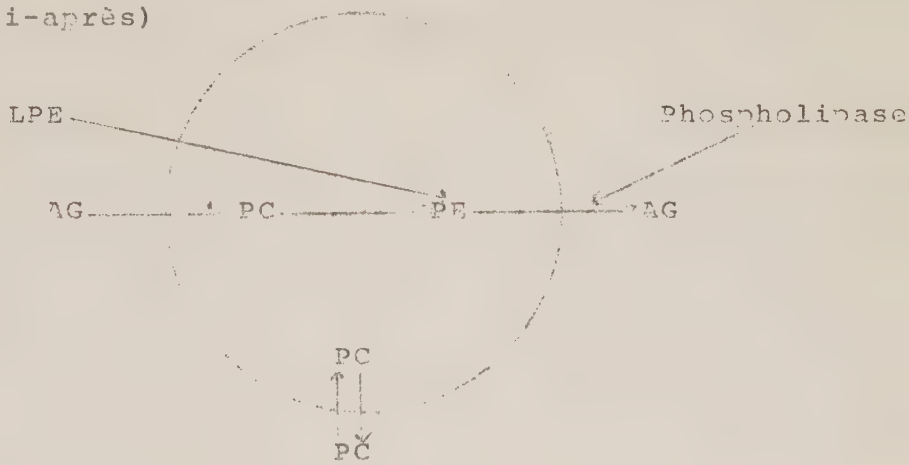
A - Etude de la phospholipase A_2 érythrocytaire

Au cours de la S.H., la perte de phospholipides membranaires est accrue et conduit directement à la microsphérocytose. Cette perte accrue semble être, nous l'avons vu, secondaire à une anomalie protéique membranaire génétiquement transmise. Cette protéine interviendrait-elle dans le métabolisme phospholipidique par l'intérmédiaire d'un mécanisme enzymatique ?: c'est dans le cadre d'une telle hypothèse que nous avons dosé l'activité phospholipasique des G.R. dans la S.H.

1 - Hypothèse

Dans la membrane du G.R. adulte normal existe une phospholipase A_2 dont l'activité est faible.

Le métabolisme phospholipidique du G.R. adulte peut être schématisé de la façon suivante d'après SHOHET (68)(figure ci-après)



Légende

LPE = lysophosphatidyl éthanolamine
PE = phosphatidyl éthanolamine
LPC = lysophosphophatidylcholine
PC = phosphatidylcholine = lécithine
AG = acide gras libre

Cette activité peut être fortement stimulée par un ou des activateurs présents notamment dans un extrait plaquettaire isolé de sang de rat (57). Cet activateur transforme une prophospholipase inactive en phospholipase active.

Dans la S.H., il était donc possible d'envisager qu'un activateur intramembranaire notamment protéique libère de la phospholipase A_2 active en quantité pathologique. Cette phospholipase A_2, qui semble agir surtout sur les "phosphatides acides" cataboliserait exagérément la phosphatidyl éthanolamine (PE) en lysophosphatidyl éthanolamine (LPE) et acide gras libre.

Le fait que des travaux antérieurs ne trouvaient pas d'élévation globulaire de LPE ou de diminution sélective d'un phospholipide n'interdisait pas cette hypothèse : des mécanismes de réacylation pouvant compenser cette désacylation.

Dans des conditions de déplétion métabolique, cette compensation ne serait plus suffisante et le déséquilibre phospholipidique entraînerait une perte de tout un fragment lipidique de membrane fait de cholestérol et de phospholipides

2 - Technique du dosage de la phospholipase A_2

La phospholipase A_2 de l'extrait globulaire est dosée selon la méthode mise au point par Mme PAYSAN et coll. (57) : par son action sur un substrat exogène, le Phosphatidylglycérol (PG), marqué au Phosphate ^{32}P qu'elle transforme en lysophosphatidylglycérol, ou LPG marqué. Son activité sera exprimée en millimicromoles de LPG formé par ml. de G.R., et pendant 15 minutes d'incubation(mμM LPG/ml/15mn)

a - préparation du substrat exogène radioactif

Le PG marqué au Phosphate ^{32}P est extrait des phospholipides d'une souche de Staphyloccocus aureus cultivée sur un milieu radioactif contenant du phosphate 32 P. Les Staphylocoques sont repiqués dans des tubes à centrifuger stériles contenant chacun un bouillon nutritif. Après une nuit d'incubation à 37°, les tubes sont centrifugés, les

.../...

culôts réunis et repris par du bouillon. Cette suspension est répartie dans 24 boîtes de Pétri à raison de 0,5 ml par boîte, chacune d'elle ayant reçu 20 ml de gélose additionnée de 1,5 mc_i de phosphate radioactif. Les cultures sont laissées à 37° pendant 6 heures puis mises en suspension par grattage de la gélose en présence de tampon phosphate 0,2 M PH 7. La suspension bactérienne est alors centrifugée, le surnageant écarté et le culot lavé par le même tampon phosphate mais 0,02M, afin d'éliminer le Phosphate inorganique ^{32}P non incorporé dans les staphylocoques.

L'extraction du Phosphatidylglycérol marqué commence par une extraction lipidique des culots bactériens par du chloroforme-méthanol 1/2 (v/v). L'extrait lipidique est purifié par la technique de FOLCH (16), de façon à éliminer les substances hydrosolubles marquées, puis fractionnées sur une colonne d'acide silicique (45) par des mélanges chloroforme-méthanol enrichis progressivement en méthanol : le phosphatidylglycérol ^{32}P est élué dans le mélange chloroformeméthanol 7/1 (v/v). Sa pureté est vérifiée par chromatographie en couche mince de gel de silice migrant en phase neutre et acide (56) et pose d'un autoradiogramme. Le comptage de radioactivité et le dosage de phosphore (13) permettent de déterminer l'activité spécifique du phospholipide ainsi préparé.

Ce substrat est ultrasonné en présence de tampon Tris 0,05 M ph 7,4 pendant 10 mn sous 250 watts, dans un appareil à ultrasons Raythéon avec fréquence de 10 Kilocycle par secondes.

b - Préparation de l'extrait enzymatique

Le sang est prélevé sur ACD. Après séparation du plasma, les G.R. sont lavés 2 fois par une solution saline 9 ‰ NaCl. Les leucocytes et les plaquettes sont enlevés aussi complètement que possible ; la prise globulaire est effectuée au fond du tube afin de réduire la contaminati

.../...

Les G.R. sont lysés par 4 volumes d'eau distillée ; une addition de ClNa en concentration finale molaire permet de stabiliser le lysat ; les stromas sont séparés par ultracentrifugation à la centrifugeuse Sorvall 10 mn à 18 000t/mn. Le lysat ainsi préparé contient la phospholipase A_2 qui, bien que probablement membranaire, puisque tous les phospholipides du G.R. le sont, passe en solution lors de la lyse globulaire.

c - Technique d'incubation et mise en évidence de l'activité enzymatique

Les incubations sont effectuées à 37° dans des tubes à centrifuger soumis à une agitation mécanique pendant 15 mn. Chaque tube contient le substrat en émulsion (0,5 µg de P), le tampon Tris 0,05 M à PH 7,4 et l'extrait enzymatique. Les effecteurs employés sont $CaCl_2$ 6,25 10^{-4} M et NaCl 0,25 M dans le milieu d'incubation.

L'activité enzymatique est arrêtée par addition de 10 ml de mélange Chloroforme-Méthanol 1/2 (v/v) qui extrait simultanément les lipides du milieu notamment substrat et produit de la réaction. Les extraits sont évaporés et repris par un volume 1/1, fonction de l'âge du substrat (demi-vie du ^{32}P = 14,5 j.)

L'analyse du Lysodérivé formé (LPG) est effectué par chromatographie en couche mince sur Silicagel G et migration en phase neutre pendant 1 heure. Cette technique sépare les phospholipides diacylés des monoacylés obtenus après hydrolyse enzymatique. Les composés sont localisés par autoradiographie de la plaque. L'acide silicique correspondant à chacun d'eux est gratté, recueilli dans une coupelle et la radioactivité comptée.

On en déduit le pourcentage du Lysodérivé formé par rapport au phospholipide initial. L'activité enzymatique est exprimée en mµM de LPG pendant 15 mn et par ml de GR.

.../...

3 - Résultats

Chez 5 sujets porteurs d'une maladie de Minkowski Chauffard typique répondant aux critères que nous avons déjà définis, nous n'avons pas trouvé de modification de la phospholipase A_2 globulaire. 4 sujets n'étaient pas splénectomisés, un l'était. Aucune différence significative n'a pu être notée entre eux (tableau n°3 et fig N° 2)

Les chiffres normaux de phospholipase A_2 globulaire testés sur 10 sujets normaux ont été trouvés à 290 $\pm$ 129 mμM LPG/15mn/m1GR.

L'elliptocytose, dont nous avons déjà parlé, ne présentait pas non plus d'activité enzymatique phospholipasique pathologique 100 mμM LPG/15mn/ml GR.

Nous avons pensé que la phospholipase de ces sujets pourrait être anormale dans son activation et nous avons testé, face à des témoins, son activation par un extrait brut de trypsine, mais aucune anomalie n'a pu être décelée dans les deux cas étudiés de cette façon.

Activité enzymatique muM LPG/ml/15 mn	
N° 1	7 000
N° 2	10 000

la normale étant de 5000 à 10 000 muM LPG/15m/ml GR

Splénectomie		âge	Réticulocytes	Activité enzymatique m MuLPG/15mn/mlGR
N° 1	NON	6 ans	510 000	216
N° 2	NON	45 ans	340 000	296
N° 3	NON	5 ans	540 000	210
N° 4	NON	5 ans	690 000	160
N° 5	OUI	35 ans	50 000	300

TABLEAU 3

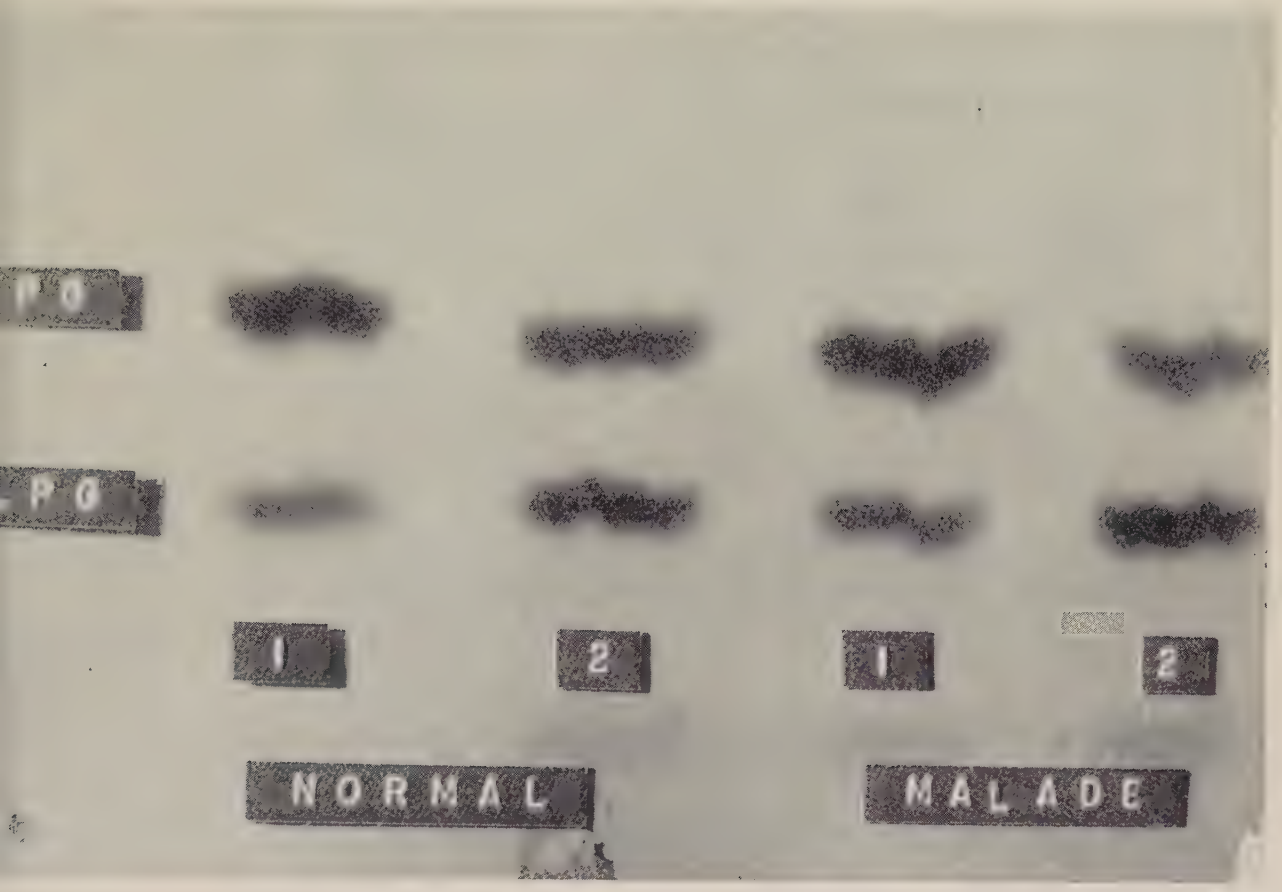


Photo n° 2

Mise en évidence de l'activité phospholipasique des G.R. par analyse chromatographique et autoradiographique, du produit formé : le Lysophosphatidylglycérol 32 P (L.P.G.) à partir du substrat le phosphatidylglycérol 32 P (P.G.). Etude comparée à deux concentrations enzymatiques différentes (1 = 0,01 ml de GR ; 2 = 0,02 ml de GR) chez le sujet normal et sphérocytaire. La différence entre les deux n'est pas significative.

B - Etude de la lipase globulaire

L'incorporation du Phosphate ^{32}P dans les phospholipides érythrocytaires étant augmentée dans la S.H. et cette augmentation étant, à notre avis, un reflet de l'hypermétabolisme du G.R., nous avons cherché à mettre en évidence une élévation de l'activité enzymatique de la lipase scindant les triglycérides en diglycérides précurseurs directs de l'acide phosphatidique. Et, ceci nous a conduit à montrer qu'il n'y a pas parallélisme entre l'incorporation du phosphate ^{32}P et l'activité lipasique, mais à suspecter une relation entre l'activité lipasique et l'état hémolytique du sujet.

a - Technique

La lipase globulaire est dosée par son action sur un triglycéride exogène marqué au Carbone 14 : la Trioline ^{14}C.

La solution acqueuse de substrat est préparée de la façon suivante (37) : le triglycéride dissous dans de l'éther de pétrole est additionné de Triton x 100 qui stabilise la solution tandis que l'éther est évaporé à 65°. L'eau distillée est ensuite ajoutée goutte à goutte à 65° C.

Le milieu d'incubation est fait de : 0,02 µM de Trioleine ^{14}C, tampon phosphate PH 7, 0,1 M en concentration finale de 1 ml, solution de penicilline-streptomycine 50 ug dans le milieu ; enfin sont ajoutés les G.R. lavés trois fois à l'eau physiologique, en quantité variable (0,05 à 0,2 ml). Le milieu d'incubation est complété à 1 ml avec l'eau physiologique ph 7.

L'incubation se fait 2 heures à 37° avec agitation.

.../...

Elle est arrêtée par extraction lipidique avec 5 ml d'un mélange isopropanol-Heptane-acide sulfurique normal (40/10/1) (v/v/v).

L'extraction est complétée par adjonction de 3ml d'Heptane et de 1 ml d'$H_2 SO_4 N$: les lipides passant dans la phase supérieure sont prélevés. La phase inférieure est lavée une fois à l'Heptane.

Les extraits lipidiques sont évaporés, repris par 0,5 ml d'Heptane et déposés sur une chromatographie de gel de silice avec migration 30 mn dans une phase : éther de pétrole, éther éthylique, acide acétique 90/30/1 (v/v/v). Enfin est posé un autoradiogramme qui permet de localiser les triglycérides et acides gras libres ; leur emplacement est gratté et compté au compteur à scintillation. L'activité est exprimée en mμM acide gras libéré par heure et par ml de GR.

b - résultats

Alors que l'incorporation du phosphate ^{32}P semble élevée de façon constante, que le sujet soit ou non splénectomisé ou en poussée hémolytique, l'activité du globule sphérocytaire est variable : chez 3 sujets non splénectomisés avec réticulocytose élevée, du même ordre de grandeur, l'activité lipasique est trouvée normale dans un cas, mais double de la normale dans les deux autres cas ; la normale a été établie à partir de 10 sujets témoins aux chiffres de réticulocytes normaux.

Ces résultats sont difficiles à interpréter du fait du petit nombre de cas .

.../...

	Réticulocytes /mm^3	Activité Lipasique mμuM/h/ml GR
Mr P. 6 ans	500 000	50
MelleO. 5 ans	690 000	123
Mme B. 45 ans	400 000	120

Activité lipasique du G.R. humain sphérocytaire. La valeur normale déterminée par une moyenne des chiffres trouvés chez 10 sujets normaux est de 50 ± 10 m μM/h/ml GR.

c - Interprétation

Comment peut être interprétée l'élévation de la lipase globulaire trouvée dans 2 cas ? Il est difficile de penser que la lipase dont le rôle est d'hydrolyser les triglycérides, joue un rôle de déclenchant majeur dans une poussée hémolytique, les triglycérides n'étant qu'un constituant mineur de la membrane globulaire.

Il serait possible que l'hyperactivité lipasique corresponde à l'hypermétabolisme encore accentué et débordé lors d'une poussée hémolytique : il est cependant curieux de ne pas constater, si le but métabolique de cette lipase était l'acide phosphatidique, une élévation de l'activité lipasique lorsque l'incorporation au phosphate est augmentée.

L'interprétation la plus probable est cependant que la lipase n'est pas augmentée dans la sphérocytose elle-même, mais que l'élévation constatée en poussée hémolytique est dûe à la très forte réticulocytose.

Dans cette optique, le taux normal trouvé dans un cas serait en fait le témoin d'une activité lipasique basse du G.R. adulte compte-tenu de la forte réticulocytose. L'unicité de ce cas ne permet pas de conclure.

.../...

V - PLACE DES LIPIDES DANS LE CADRE GENERAL DE LA CONCEPTION PHYSIOPATHOLOGIQUE ACTUELLE DE LA MALADIE

1 - La conception physiopathologique actuelle

A - De nombreux travaux permettent aujourd'hui d'affirmer que l'anomalie fondamentale de la S.H. est due, non seulement à un défaut intrinsèque du GR (ce qui fut démontré par Dacie dès 1943 (10), et largement confirmé ultérieurement par les études isotopiques) mais à un défaut intrinsèque de la membrane :

Ce fait a pu être affirmé :

a - sur des arguments indirects : tenant à l'interprétation des tests de laboratoire.

b - sur des arguments expérimentaux : l'altération des groupements sulfhydryls de la membrane par des inhibiteurs spécifiques des groupes thiols donne naissance à des sphérocytes qui se comportent morphologiquement et physiologiquement comme ceux de la S.H. (29).

c - sur des arguments d'élimination : les recherches d'une anomalie du contenu corpusculaire se sont avérées négatives. En effet :

- il n'y a aucune anomalie de l'hémoglobine au cours de la S.H. (74)

- il n'y a pas non plus, selon la grande majorité des auteurs, d'altération du contenu enzymatique du G.R., que ce soit sur la voie d'Emben Meyerhoff, sur le shunt des Pentoses ou les enzymes du métabolisme du glutathion (4-23).

d - sur des arguments directs enfin :

- des "fragments de membrane" se détachent, comme nous l'avons vu, prématurément des G.R. de S.H. durant l'incubation en condition de déplétion métabolique créant la microsphérocytose (7-34-62-77)

.../...

- les membranes de S.H. ont un aspect particulier en microscopie électronique à balayage (66)

- les préparations de "fantômes cellulaires" de G.R. de S.H., c'est-à-dire de membranes intactes totalement dépourvues du contenu intraérythrocytaire, présentent les mêmes anomalies physiologiques, notamment au niveau du trouble des échanges cationiques, et les mêmes anomalies physiques, en particulier une rigidité intrinsèque accrue, avec résistance à la traversée de tubes microcapillaires, que les cellules entières (24-40).

B - Depuis 1970, il semble avoir été démontré que c'est au niveau des protéines de la paroi qu'est située la malformation biochimique responsable (35-36). L'anomalie résiderait au niveau d'une protéine fibrillaire de structure et serait responsable d'une diminution des groupements thiols disponibles avec un potentiel de ponts disulfures plus restreint.

C - A partir de cette notion fondamentale, on peut intégrer toutes les notions déjà connues sur la physiopathologie de la maladie dans le tableau n° .

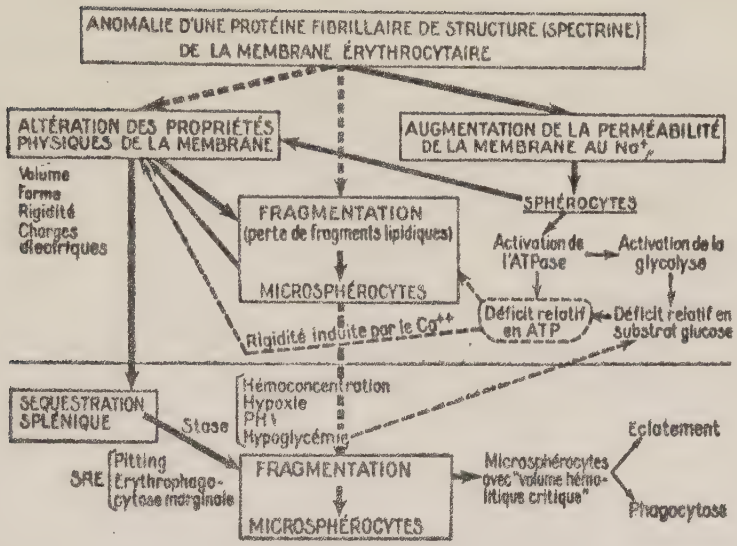
a - l'erreur constitutionnelle est très probablement une anomalie d'une proteine fibrillaire de structure de la membrane érythrocytaire. (73-74).

b - Cette anomalie a trois conséquences physicochimiques immédiates qui secondairement sont en étroites corrélations entre elles et avec le métabolisme énergétique du G.R. Ce sont :

- une altération des propriétés physiques fondamentales de la membrane érythrocytaire (volume, forme, souplesse, déformabilité, charges électriques) (40)

- une instabilité accrue des lipides de la paroi dont nous avons déjà parlé antérieurement, aboutissant à la microsphérocytose. Ce microsphérocyte sphérique est

.../...



PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE MINKOWSKI-CHAUFFARD

rigide ; ceci accroît l'altération des propriétés physiques de la membrane, qui, inversement en partie au moins du fait d'une fragilité mécanique accrue, favorise la fragmentation.

- une augmentation de la porosité de la membrane.

Dans la S.H., la perméabilité au sodium est accrue (30-31-32), l'hémoglobine et le phosphate continuant à exercer une pression oncotique égale, l'entrée supplémentaire de Na^+ entraîne un appel supplémentaire d'eau qui fait gonfler la cellule : c'est le mécanisme de la sphérocytose. Le sphérocyte distendu est rigide ce qui va accroître l'altération des propriétés physiques fondamentales de la membrane.

L'élévation du sodium intraérythrocytaire entraîne une activation de l'A.T.Pase et de la pompe à sodium, qui tend à lutter contre l'inflation hydrosodée en rejetant à l'extérieur du G.R. les ions Na^+ en excès.(81) l'élévation de l'activité A.T. Pasique entraîne un déficit relatif en ATP comblé par une activation de la glycolyse qui nous l'avons vu est par ailleurs normale.

Cette activation de la glycolyse a elle-même pour conséquence un déficit relatif en substrat glucose.

2 - Où se situe l'anomalie lipidique dans ce schéma général ?

a -On peut concevoir que s'il existe une anomalie structurale ou fonctionnelle d'une protéine membranaire, l'affinité des lipides pour cette lipo-protéine soit modifiée. La diminution d'affinité lipoprotéinique rendrait compte de la perte des phospholipides et de cholestérol par la membrane érythrocytaire et notamment, selon les hypothèses

.../...

récentes de structure hybride des membranes (68), il pourrait s'agir de la partie lipidique faiblement liée aux proteines ; la perte d'une micelle lipidique serait séduisante pour expliquer la perte en proportion équivalente à celle de la membrane, de cholestérol et de phospholipides

La perte d'un fragment lipidique membranaire, nous l'avons vu, est responsable de la microsphérocytose et accroît encore l'altération des propriétés physiques de l la membrane érythrocytaire.

b - Il semble qu'un complexe ATP Ca^{++} puisse commander l'état physique de la zone d'interface gel/sol située entre la membrane et le contenu cellulaire (79). Après plusieurs heures d'incubation en condition de déplétion métabolique le taux de l'ATP diminue notablement tandis que celui du calcium augmente considérablement. Ces anomalies allant de paire avec des perturbations physiques de la membrane : viscosité, déformabilité, filtrabilité ainsi que perte de surface membranaire aboutissant à un microsphérocyte. Or dans la S.H. existe, nous l'avons vu, un déficit relatif en ATP, et l'ATP ayant un rôle chélateur du calcium, une tendance à l'augmentation du calcium intraérythrocytaire. Une modification du couple ATP Ca^{++} pourraît donc intervenir dans la genèse des anomalies physicochimiques de la membrane des G.R. de S.H. Son mode d'action pourrait se situer au niveau d'une protéine membranaire (83) et son rôle dans l'affinité de cette protéine de structure avec les lipides membranaires est possible.

ceci explique

c - d'autre part, l'ATPase qui, nous l'avons vu, est directement en jeu dans la régulation des flux sodés, nécessite, lorsqu'elle est solubilisée, la présence de phospholipides (15).

.../...

Les phospholipases A et C, la lysolécithine inhibent son activité (65). Des modifications phospholipidiques ou phospholipasiques pourraient donc rendre compte de variations de cette activité ; cependant; l'action de solvants organiques sur des "fantômes" globulaires, visant à extraire les lipides faiblement liés, ne modifie pas l'activité ATPasique (65). La relation entre cet enzyme et les lipides membranaires est donc obscure.

VI - CONCLUSION

Nous avons confirmé que l'incorporation du phosphate ^{32}P dans les phospholipides des G.R. de Sphérocytose héréditaire est effectivement augmentée et nous avons précisé le lieu de son incorporation. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans les mêmes conditions expérimentales chez un sujet porteur d'une Elliptocytose héréditaire n'a pas montré de différence significative.

En intégrant ces faits aux différents travaux déjà publiés sur ce sujet, nous pensons que ce phénomène entre dans le cadre de l'élévation globale du métabolisme cellulaire, élévation qui apparaît comme conséquence de l'hyperperméabilité aux cations. L'augmentation du renouvellement du phosphate phospholipidique érythrocytaire dans la S.H. apparaît comme un phénomène secondaire, de faible importance et qui ne saurait être la cause des symptômes biologiques de la maladie.

Nous avons montré que l'instabilité des lipides membranaires et l'hypocholestérolémie observée de façon statistiquement significative dans la maladie n'étaient pas en rapport avec l'intervention d'un phénomène enzymatique extracorpusculaire, dans la mesure où l'activité L.C.A.T. du sérum n'est pas modifiée et qu'il s'agit de l'enzyme fondamentale agissant sur les échanges lipidiques entre le G.R. et le plasma.

Ceci confirme que siège dans la membrane le phénomène primitif responsable du trouble des échanges lipidiques et si, comme tendent à le prouver les expériences de JACOB, l'anomalie d'une protéine de structure est responsable de l'ensemble des symptômes biologiques observés, nous avons montré que cette protéine n'intervient pas dans le déséquilibre lipidique par une modification de l'activité d'enzymes

.../...

clés du métabolisme lipidique du G.R. : lipase et phospholipase. Le défaut protéique intervient probablement dans le métabolisme lipidique par des modifications d'affinité entre protéines et lipides, soit directement du fait d'une modification structurale, soit indirectement par l'intermédiaire de cofacteurs, tels le couple ATP Calcium.

Vu
Le Président
Signé : J. BERNARD

Vu
Le Doyen
Signé : A. GROSSIORD

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
Signé : R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALLISON A.C., LOVELOCK J. E.
Synthesis of lipids by different human blood cell types
Biochim. Biophys. Acta. 41 : 310 - 1960

2 - ASHWORTH L.A.E., GREEN C.
The transfer of Lipids between human lipoproteins and erythrocytes
Biochim. Biophys. Acta. 84 : 182 - 1964

3 - BASFORD J.M., GLOVER J., GREEN C.
Exchange of cholesterol between human lipoproteins and erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta. 84 : 764 - 1964

4 - BUTENANDT O.
The activity of glutathion peroxydase, Glucose 6 phosphate deshydrogenase and glutathion reductase in spherocytes
Acta. Haemat. 43 : 348 - 1970

5 - CHAPMAN R.G., MC DOWALD L.L.
Red cell life span after splenectomy hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest 47 : 2263 - 1968

6 - COOPER R.A., JANDL J.H.
Physiologic and pathologic alterations of red cell lipids, membrane and shape
in Deutsch E, GERLACH E., MOSER K.(Eds) Metabolism and membrane permeability of erythrocytes and thrombocytes - Stuttgart Georg. Thieme 376 - 1968

7 - COOPER R.A., JANDL J.H.
The selective and conjoint loss of red cell lipids
J. Clin. Invest. 48 : 906 - 1969

8 - COOPER R.A., JANDL J.H.
The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 48 : 736 - 1969

9 - COOPER R.A.
Lipids of human red cell membrane : normal composition and variability in disease
Seminars in hematology 7 : 296 - 1970

10 - DACIE Y.V., MOLLISON P.L.
Survival of normal erythrocytes after transfusion to patients with familial haemolytic anemia (acholuric jaundice)
Lancet 1 : 550 - 1943

.../...

11 - DAWSON R.M.C.
A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples
Biochem. J. 75 : 45 - 1960

12 - DE GIER J., VAN DEENEN L.L.M., VERLOOP M.C., VAN GASTEL C.
Phospholipid and fatty acid characteristics of erythrocytes in some cases of anaemias
Brit. J. Haemat. 10 : 246 - 1964

13 - DELSAL J.L., MANHOURI H.
Etudes comparatives des dosages colorimétriques de phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie
Bull. Soc. Chim. Biol. 37 : 1041 - 1955

14 - DISCOMBE G.
The quantitative description of the fragility of the erythrocyte
J. Path. Bact. 60 : 315 - 1948

15 - FENSTER L.J., COPENHAVER J.H.
Phosphatidylserine requirement of (Na^+K^+) activated adenosine triphosphatase from rat kidney and brain.
Biochim. Biophys. Acta. 137 : 406 - 1967

16 - FOLCH-PI J., LEES M., SLOAWE-STANLEY G.M.
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J. Biol. Chem. 226 : 997 - 1957

17 - GLOMSET J.A., WHRIGHT J.L.
Some properties of a cholesterol esterifying enzyme in human plasma.
Biochim. Biophys. Acta. 89 : 226 - 1964.

18 - GLYNN I.M.
Activation of adenosine triphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium
J. Physiol. (London) 160 : 18 - 1962

19 - GOULD R.G., LEROY G.V., OMITA G.T., KABARA J.J., KEEGAN P., BERGENSTAL D.M.,
The use of ^{14}C labeled acetate to study cholesterol metabolism in man.
J. Lab. Clin. Med. 46 : 372 - 1955

20 - GRAY G.M.
Biochem. Biophys. Acta. 84 : 35 - 1964

.../...

21 - GROSSMAN C.M., HORKY J., KOHN R.
In vitro incorporation of ^{32}P orthophosphate into phosphatidyl ethanolamine and other phosphatides by mature human erythrocyte ghosts
Arch. Biochem. 117 : 13 - 1966

22 - HAGERMAN J.S., GOULD R.G.
The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78 : 329 - 1951

23 - HANES TE, PATTERSON J., VAN EYS J.
Red cell aldolase and other enzyme activities in hereditary spherocytosis
J. Lab. Clin. Med. 75 : 654 - 1970

24 - HOFFMAN J.F.
The active transport of Na^+ by red blood cell ghosts
J. Gen. Physiol. 45 : 837 - 1962

25 - HOKIN L.E., HOKIN M.R.
Phosphatidic acid metabolism and active transport of sodium
Fed. Proc. 22 : 8 - 1963

26 - HOKIN L.E., HOKIN M.R., MATHISON D.
Phosphatidic acid phosphatase in the erythrocyte membrane
Biochim. Biophys. Acta. 67 : 485 - 1963

27 - HOKIN L.E., HOKIN M.R.
The incorporation of ^{32}P from triphosphate into polyphosphoinositides, ^{32}P adenosine, and phosphatidic acid in erythrocyte membrane
Biochim. Biophys. Acta. 84 : 563 - 1964

28 - IZRAEL V.
Maladie de Minkowski-Chauffard. Etude de 229 cas et revue générale
Actualités Hématologiques Masson 1971

29 - JACOB H.S., JANDL J.M.
Effects of Sulfhydryl inhibition on red blood cells Mechanisms of hemolysis
J.Clin. Invest. 41 : 779 - 1962

30 - JACOB H.S., JANDL J.H.
Increased cell membrane permeability in the pathogenesis of hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 43 : 1704 - 1964

31 - JACOB H.S.
Hereditary Spherocytosis : a disease of the red cell membrane
Seminars In Hematology 2 : 139 - 1965

.../...

32 - JACOB H.S.
Abnormalities in the physiology of the erythrocyte membrane in hereditary spherocytosis
Amer. J. Med. 41 : 734 - 1966

33 - JACOB H.S., KARNOVSKY M.L.
Concomitant alterations of sodium flux and membrane phospholipid metabolism in red blood cells : studies in hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 46 : 173 - 1967

34 - JACOB H.S.
Membrane lipid depletion in hypermeable red blood cells : its role in the genesis of spherocytes in hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 46 : 2083 - 1967

35 - JACOB H.S., RUBY A., OVERLAND E.S., MAZIA D.
Abnormal membrane protein of red blood cells in hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 50 : 1809 - 1971

36 - JACOB H.S., AMSDEN T.H., WHITE J.
Membrane microfilaments of Erythrocytes : Alteration in intact cells reproduces the H.S. syndrome
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69 : 471 - 1972

37 - KAPLAN A., MEIHUI TENG
Interaction of heef liner lipase with mixed micelles of tripalmitive and triton x 100
Journ. Of. Lipid. Res. 12 : 324 - 1971

38 - KNIPPR P.J.C., LIVNE A.
Differences in fatty acid composition between norma human erythrocytes and hereditary spherocytosis affected cells.
Biochim. Biophys. Acta. 260 : 755 - 1972

39 - KURLAND G.S., LUCAS J.C., FRIEDBERG A.S.
The metabolism of intravenously infused ^{14}C labeled cholesterol in enthyroïdism and myxoederma
J. Lab. Clin. Med. 57 : 571 - 1961

40 - LACELLE P., WEED R.I.
Reversibility of abnormal deformability and permeability of the hereditary spherocytes
Blood 34 : 858 - 1969 (Abstract)

41 - LANGLEY G.R., FELDERHOF C.H.
Atypical autohemolysis in hereditary Spherocytosis as a reflection of two cell populations : Relationship of cell lipids to conditioning by the spleen
Blood 32 : 569 - 1968

.../...

42 - LONDON I.M., SCHWARTZ H.
Erythrocyte metabolism. The metabolic behavior of the cholesterol of human erythrocytes
J. Clin. Invest. 32 : 1248 - 1953

43 - MACHEBOEUF M., DELSAL J.L.
Recherches sur le dosage colorimétrique de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié
Bull. Soc. Chim. Biol. 24 : 296 -1942

44 - MAC KINNEY A.A.
Hereditary spherocytosis : clinical family studies
Arch. Int. Med. 116 : 257 - 1965

45 - MARINETTI V., ERBLAND J., ALBRETCH M. STOLZ E.
The in vitro incorporation of ^{32}P labeled orthophosphate into the phosphatides of isolated rat liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta. 26 : 130 - 1957

46 - MORTON N.E., MAC KINNEY A.A., KOSOWER N., SHILLING R. GRAY M.P.
Genetics of spherocytosis
Amer. J. of Human Genetics 14 : 170 - 1962

47 - MULDER E., VAN DENBERG J.W.O., VAN DEENEN L.L.M.
Metabolism of red cell lipids - II - Conversion of lysophosphoglycerides
Biochim. Biophys. Acta. 118 : 106 - 1965

48 - MURPHY J.R.
Erythrocyte metabolism. Equilibration of Cholesterol $4^{14}C$ between erythrocytes and variously treated sera
J. Lab. Clin. Med. 60 : 571 - 1962

49 - MURPHY J.R.
Erythrocyte metabolism III - Relationship of energy metabolism and serum factors to the osmotic fragility following incubation.
J. Lab. Clin. Med. 60 :86 - 1962

50 - NAKAO K., KURASHINA S., NAKAO M.
Adenosine triphosphatase activity of erythrocyte membrane in hereditary spherocytosis
Life Sci. 6 : 595 - 1967

51 - NATHAN D.G., KARNOVSKY M.L.
Stages in the incorporation of fatty acids into red blood cells
J. Clin. Invest. 47 : 1096 - 1968

52 - NELSON G.J.
Studies on the lipids of sheep red blood cells
I - lipids composition in low and high potassium red cells
Lipids 2 : 64 - 1967

53 - NELSON G.J.
Studies on the lipids of sheep blood cells
III the fatty acid composition of phospholipid in HK and LK cells
Lipids 4 : 350 - 1969

54 - OLIVEIRA M.M., VAUGHAN M.
Incorporation of fatty acids into phospholipids of erythrocyte membrane
J. Lipid. Res. 5 : 156 - 1964

55 - OSKI F.A., NAIMAN J.L., BLUM S.F., ZARKOWSKY H.S. WHAUN J., SHOHET J.B., GREEN A., NATHAN D.G.
Congenital hemolytic anemia with high sodium, low potassium red cells. Studies of three generations of a family with a new variant.
New. Engl. J. Med. 280 : 909 - 1969

56 - PAYSANT M., SOLER C., WALD R., POLONOVSKY J.
Action enzymatique de la rate de rat sur le phosphatidylglycérol
Bull. Soc. Chim. Biol. 48 : 863 - 1966

57 - PAYSANT M., BITRAN M., WALD R., POLONOVSKY J.
Phospholipase A des globules rouges chez l'homme. Action sur les phospholipides endogènes et exogènes
Bull. Soc. Chim. Biol. 52 : 1257 - 1970

58 - PHILLIPS G.B., ROOME N.S.
Quantitative chromatographic analysis of the phospholipids of abnormal human red cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109 : 360 - 1962

59 - PITTMAN J.G., MARTIN D.B.
Fatty acid biosynthesis in human erythrocytes evidence in mature erythrocytes for an incomplete long chain fatty acid synthezing system
J. Clin. Invest. 45 : 165 - 1966

60 - PORTE D., HAVEL R.J.
The use of Cholesterol 4 ^{14}C labeled lipoproteins as a tracer for plasma cholesterol in the dog
Journ. Lip. Res. 2 : 357 - 1961

61 - REED C.F., MARINETTI G.V., EDEN E.G.
Studies of the lipids of the erythrocyte I .
Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cells.
J. Lab. Clin. Med. 56 : 281 - 1960

62 - REED C.F., SWISHER S.N.
Erythrocyte lipid loss hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 45 : 777 - 1966

.../...

63 - REED C.F.
Incorporation of orthophosphatase ^{32}P into erythrocyte phospholipids in normal subjects and in patients with hereditary spherocytosis
J. Clin. Invest. 47 : 2630 - 1968

64 - REED C.F.
Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog
J. Clin. Invest. 47 : 749 - 1969

65 - ROELOFSEN B., BAADEN HUYSEN H., VANDEENEN L.L.M.
Effects of organic solvents on the adenosine triphosphatase activity of erythrocyte ghosts
Nature 212 - 1379 - 1966

66 - SALISBURY A.J., CLARKE J.A.
New method for detecting changes in the surface appearance of human red blood cells
J. Clin. Pathol. 20 : 603 - 1967

67 - SEEN A.K., POST R.L.
Stoechiometry and localisation of adenosine triphosphate dependant sodium and potassium transport in the erythrocyte
J. Biol. Chem. 345 : 239 - 1964

68 - SHOHET S.B.
Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids I
New. Engl. J. of. Med. 286 : 577 - 1972

69 - SKIPSKI V.P., PETERSON R.F., BARCLAY M.
Quantitative analysis of phospholipid by thin layer chromatography
Biochem. J. 90 : 374 - 1964

70 - SKIPSKI V.P., SMOLOWE A.F., SULLIVAN P.C., BARCLAY M.
Separation of lipid classes by thin layer chromatography
Biochim. Biophys. Acta 106 : 386 - 1965

71 - STAHL E.
Chem. Zeitung 82 : 323 - 1958

72 - SVENNERHOLM L.
The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissues.
Journ. Neurochim. 1 : 42 - 1956

73 - SWEELEY C.C., DAWSON G.
Lipids of the erythrocyte in Jamieson G.A. and Green walt T.J. (Ed.) Red cell membrane structure and function. Philadelphia J.B. Lippincott 1969 p.172

.../...

74 - VALENTINE W.N.
The normal metabolism of human erythrocytes and hemolytic anemia due to inborn errors
XII Congress intern. Soc. Hemat. New. York 1968 p.160

75 - VAN GASTEL C., VAN DEN BERG B., DEGIER J., VAN DEENEN
Some lipid characteristics of normal red blood cells of different age
Brit. J. Haemat. 11 : 193 - 1965

76 - WAYS, HAWAMAN D.J.
Characterization and quantification of red cell lipids in normal man
J. Lipid. Res. 5 : 318 - 1964

77 - WEED R.I., REED C.F.
Membrane alterations leading to red cell destruction
Amer. J. Med. 41 : 681 - 1966

78 - WEED R.I., BOWDLER A.J.
Metabolic dependance of the critical hemolytic volume of human erythrocytes : relationship to osmotic fragility and autohemolysis in hereditary spherocytosis and normal red cells
J. Clin. Invest. 45 : 1137) 1966

79 - WEED R.I., LACELLE P.L., MERRILL E.W.
Metabolic dependance of red cell deformatility
J. Clin. Invest. 48 : 795 - 1969

80 - WEED R.I.
Disorders of red cell membranes. History and perspectives
Seminars in Hematology 7 : 249 - 1970

81 - WESTERMAN M.P., JENSEN W.W.
In vitro incorporation of radiophosphorus into the phosphatides of normal human blood cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 : 315 - 1965

82 - WILEY J.S.
Inheritance of an increased sodium pump in human red cells
Nature 221 : 1222 - 1969

83 - WINS P., SCHOFLENIELS E.
ATP Ca^{++} linked contraction of red cell chosts
Arch. Int. Physiol. 74 : 812 - 1966

84 - ZARKOWSKY H.S., OSKI F.A., SHAAFI R., SHOHET S.B.
NATHAN D.G.
Congenital hemolytic anemia with high sodium low potassium red cells. I Studies of membranepermeability
New Engl. J. Med. 278 : 573 - 1968